

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
10 mai 2001 (10.05.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/33223 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷:
G01N 33/543, 33/546

F-69100 Villeurbanne (FR). BIBETTE, Jérôme [FR/FR];
16, rue Boulon, F-33000 Bordeaux (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/03085

(74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU;
Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).

(22) Date de dépôt international:
6 novembre 2000 (06.11.2000)

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/14194 5 novembre 1999 (05.11.1999) FR

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*): BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). MONDAIN-MONVAL, Olivier [FR/FR]; 116, rue Brach, F-33000 Bordeaux (FR).

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): ELAIS-SARI, Abdelhamid [FR/FR]; 7, rue Jacques Monod, F-69007 Lyon (FR). BOSC, Eric [FR/FR]; 34, chemin de Blanquette, F-33770 Salles (FR). PICHOT, Christian [FR/FR]; 5, allée Roland Garros, F-69960 Corbas (FR). MANDRAND, Bernard [FR/FR]; 21, rue de la Doua,

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: COMPOSITE NANOSPHERES AND THEIR CONJUGATES WITH BIOMOLECULES

(54) Titre: NANOSPHERES COMPOSITES ET LEURS CONJUGUES AVEC DES BIOMOLECULES

(57) Abstract: The invention concerns composite nanospheres having a diameter ranging between about 50 and 1 000 nm plus or minus 5 %, preferably between about 100 and 500 nm plus or minus 5 % and advantageously between 100 and 200 nm plus or minus 5 %, and comprising an essentially liquid core consisting of an organic phase and inorganic nanoparticles, distributed inside the organic phase, and a skin consisting of at least a hydrophilic polymer derived from the polymerisation of at least one water soluble monomer, in particular N-alkylacrylamide or a N-N-dialkylacrylamide; conjugates derived from said nanospheres; their preparation methods and their uses.

(57) Abrégé: Nanosphères composites présentant un diamètre compris entre environ 50 et 1000 nm plus ou moins 5 %, de préférence entre environ 100 et 500 nm plus ou moins 5 % et avantageusement entre 100 et 200 nm plus ou moins 5 %, et comprenant: un coeur essentiellement liquide constitué d'une phase organique et de nanoparticules inorganiques, distribuées à l'intérieur de la phase organique, et une enveloppe constituée au moins d'un polymère hydrophile qui est issu de la polymérisation d'au moins un monomère hydrosoluble, en particulier un N-alkylacrylamide ou un N-N-dialkylacrylamide; conjugués dérivés desdites nanosphères; leur procédé de préparation et leurs utilisations.

WO 01/33223 A1

NANOSPHERES COMPOSITES ET LEURS CONJUGUES AVEC DES BIOMOLECULES

La microencapsulation est un procédé utilisé pour l'obtention de petites particules solides enrobées par au moins une couche de polymère. Ce procédé a notamment été utilisé pour l'obtention de poudres inorganiques revêtues d'une couche d'un polymère organique. De tels systèmes sont supposés présenter des propriétés différentes de la somme des propriétés des composants individuels, en particulier de meilleures propriétés mécaniques. Les procédés de microencapsulation ont notamment été utilisés dans le domaine de la préparation de pigments, d'encre, de plastiques et de peintures. Une des applications les plus importantes de particules et pigments encapsulés est trouvée dans le domaine des peintures en émulsion. Mais quand les particules inorganiques obtenues par encapsulation sont magnétisables, cela ouvre des voies particulières dans le domaine de la biologie, par exemple grâce au couplage de protéines ou d'anticorps sur les particules encapsulées pour une utilisation dans des essais de diagnostic. De telles particules sont également utilisées dans des procédés de séparation biochimique. D'une manière générale les particules encapsulées présentent un intérêt comme support, vecteur ou véhicule dans les domaines de l'ingénierie biologique, du diagnostic et de la pharmacie. A cet effet, elles ont été utilisées dans le diagnostic médical comme support solide pour des macromolécules biologiques.

Les particules colloïdales présentent plusieurs avantages par rapport aux supports solides traditionnels, tels que tubes et plaques, notamment parce qu'elles permettent de disposer d'une grande surface pour des interactions spécifiques et parce qu'elles sont facilement modifiables chimiquement pour introduire à leur surface des groupements fonctionnels susceptibles de réagir avec d'autres molécules, par exemple des molécules biologiques telles que des anticorps ou des fragments d'anticorps, des protéines, des polypeptides, des polynucléotides, des acides nucléiques, des fragments d'acides nucléiques, des enzymes ou des molécules chimiques telles que des catalyseurs, des médicaments, des molécules cages, des chélatants.

Parmi les particules colloïdales, les latex magnétiques ont suscité un grand intérêt dans le domaine analytique et sont utilisés par exemple comme moyen pour séparer et/ou détecter des analytes, tels que des antigènes, des anticorps, des molécules biochimiques, des acides nucléiques et autres.

5 Les particules composites de type polymère/magnétique sont habituellement classées en trois catégories sur un critère de taille: les petites particules ayant un diamètre inférieur à 50 nm, les grosses particules ayant un diamètre supérieur à 2 μ m et les particules intermédiaires d'un diamètre compris entre 50 et 1000 nm.

10 Mais pour qu'elles puissent être considérées comme de bons candidats, en particulier pour une application diagnostique, elles doivent répondre à certains critères. D'un point de vue morphologique, il est préférable qu'elles soient relativement sphériques et que la charge magnétique soit répartie de façon relativement homogène dans la matrice polymère. Elles ne doivent pas
15 s'agréger de manière irréversible sous l'action d'un champ magnétique, ce qui signifie qu'elles puissent être redispersées facilement, rapidement et de manière réversible. De même, elles doivent présenter une densité relativement faible pour réduire le phénomène de sédimentation. Avantageusement, elles doivent présenter une distribution granulométrique étroite. On parle encore de particules
20 monodisperses ou isodisperses.

Ainsi, en raison de leur taille et de leur densité, les grosses particules magnétiques en suspension dans une phase liquide ont tendance à rapidement sédimenter. Par ailleurs, elles tendent à s'agréger après avoir été soumises à un champ magnétique car elles sont susceptibles d'avoir été de ce fait magnétisées
25 de manière permanente. On parle d'aimantation rémanante. Elles ne constituent donc pas un bon candidat.

A contrario, les petites particules magnétiques ont tendance à rester en suspension du fait de leur mouvement Brownien et sont difficilement attirées, voire pas du tout, par un aimant, en particulier si le champ magnétique appliqué
30 est relativement faible. Elles ne sont donc pas bien appropriées pour les utilisations développées ci-dessus.

Il existe donc un intérêt évident à produire des particules composites de type polymère/magnétique, présentant une taille intermédiaire entre 50 et 1000 nm, qui à la fois pallient les inconvénients précités et répondent notamment aux critères établis ci-dessus. Mais l'invention n'est pas limitée à des particules composites magnétisables, comme décrit ci-après.

On peut citer les particules Dynal (nom commercial). Ces particules sont des microsphères constituées d'un cœur poreux de polystyrène et d'oxydes de fer, les oxydes de fer ayant été déposés par imprégnation au niveau des pores disponibles à la surface du polystyrène, et d'une enveloppe en un autre polymère qui encapsule les oxydes de fer des microsphères poreuses. Elles présentent un diamètre respectivement de 2,8 μm (particules M280) et de 4,5 μm (particules M450) et sont relativement uniformes en taille. Elles sont donc considérées comme des particules isodisperses mais en raison de leur taille élevée présentent les inconvénients précités, principalement le phénomène de sédimentation. De plus, leur surface spécifique est faible.

La demande de brevet EP 0 390 634 décrit des microsphères composites magnétisables de polymère vinylaromatique réticulé hydrophobe d'un diamètre de l'ordre de 50 à 10 000 nm et comprenant un cœur solide constitué de particules magnétisables et une écorce constituée d'un copolymère hydrophobe dérivé d'au moins un monomère vinylaromatique hydrophobe et d'au moins un polymère émulsifiant polyéthyléniquement insaturé soluble dans le ou les monomères vinylaromatiques et susceptible de réticuler avec le ou lesdits monomères. Toutefois, bien qu'elles puissent répondre à l'exigence de la taille, elles présentent l'inconvénient de ne pas avoir une répartition uniforme de la charge magnétique qui est localisée à l'intérieur du cœur. Par ailleurs, et comme cela ressort à l'évidence des figures annexées dans ce brevet, les particules ne sont pas homogènes en taille. Il s'agit donc d'un ensemble de particules polydisperses qui devront être fractionnées pour ne retenir que les particules de taille attendue. Enfin, du fait que les particules magnétisables à l'intérieur du cœur solide sont orientées de manière aléatoire et figées dans leur orientation, le moment magnétique résultant des microsphères composites correspond donc à la somme algébrique des moments des particules

magnétisables avec, par voie de conséquence, une diminution du moment résultant lié à cette distribution aléatoire des particules à l'intérieur du cœur solide.

Comme on le verra ci-dessous, une des caractéristiques des nanosphères composites de l'invention, quand elles sont magnétiques, est que les nanoparticules dispersées à l'intérieur du cœur essentiellement liquide sont suffisamment mobiles pour que leur moment magnétique résultant facilite une séparation sous l'action d'un champ magnétique, même faible, ce qui présente un avantage incontestable par rapport aux particules magnétiques à cœur solide du type de celles décrites dans la demande de brevet EP.0 390 634. Ceci est particulièrement avantageux quand la teneur en nanoparticules magnétique est faible.

L'invention concerne donc de nouvelles nanosphères composites encapsulées qui pallient les inconvénients précités.

Les nanosphères composites encapsulées de l'invention contiennent au niveau de leur cœur une charge de matière inorganique répartie uniformément à l'intérieur de cœur, elles sont isodisperses en taille et sont susceptibles d'être utilisées dans des domaines aussi divers que la biologie, en particulier pour le diagnostic, la préparation de peintures, d'encre ou autres.

Les nanosphères composites de l'invention présentent un diamètre compris entre environ 50 et 1000 nm plus ou moins 5%, de préférence entre environ 100 et 500 nm plus ou moins 5% et avantageusement entre 100 et 200 nm plus ou moins 5% et comprennent :

- un cœur essentiellement liquide constitué d'une phase organique et de nanoparticules inorganiques distribuées de manière homogène à l'intérieur de la phase organique, et
- une enveloppe constituée au moins d'un polymère hydrophile qui est issu de la polymérisation d'au moins un monomère hydrosoluble, en particulier un N-alkylacrylamide, un N-N-dialkylacrylamide et plus particulièrement le N-isopropylacrylamide (NIPAM), le N-méthylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, le N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le N-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-

diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide.

Plus ou moins 5% signifie que le diamètre moyen en volume est défini à plus ou moins environ 5% près. La taille est mesurée par diffusion de la lumière.

Le cœur essentiellement liquide comprend :

- (i) un hydrocarbure aliphatique ou cyclique choisi parmi les composés comprenant de 5 à 12 atomes de carbone, leurs isomères et leurs mélanges. De préférence, l'hydrocarbure est choisi parmi le pentane, l'hexane, l'heptane, l'octane, le nonane, le décane, le undécane et le dodécane, étant entendu qu'il est à la portée de l'homme du métier d'adapter les conditions de polymérisation du procédé d'obtention en fonction du choix du ou des hydrocarbure(s) retenu(s). En particulier, quand la polymérisation est effectuée par une élévation de température, le montage réactionnel devra être adapté aux hydrocarbures volatils, tels que le pentane, et à la nature de l'amorceur de polymérisation choisi,

- (ii) des nanoparticules inorganiques choisies parmi les oxydes métalliques de fer, de titane, de cobalt, de zinc, de cuivre, de manganèse, de nickel ; la magnétite ; l'hématite, les ferrites telles que les ferrites de manganèse, nickel, manganèse-zinc; les alliages de cobalt, nickel ; les zéolites ; le talc ; les argiles telles que bentonite et kaolin ; l'alumine ; la silice ; le graphite ; le noir de carbone ou autres matériaux inorganiques. De préférence, les matériaux inorganiques sont choisis parmi les oxydes métalliques de fer, de titane, de cobalt, de zinc, de cuivre, de manganèse, de nickel ; la magnétite ; l'hématite, les ferrites telles que les ferrites de manganèse, nickel, manganèse-zinc; les alliages de cobalt, nickel.

Le cœur ainsi défini peut de plus comprendre un marqueur, tel qu'un marqueur fluorescent, luminescent ou radioactif, étant entendu que le marqueur est introduit lors de la préparation de l'émulsion telle que décrite dans l'exemple 1 qui suit.

Les nanoparticules inorganiques représentent de 5 à 95%, de préférence de 10 à 90%, de manière encore plus préférée de 20 à 80% et

avantageusement de 50 à 80% en masse par rapport à la masse totale des nanosphères composites.

Dans un mode de réalisation de l'invention, l'enveloppe comprend un polymère hydrophile tel que défini ci-dessus qui constitue une couche externe de ladite enveloppe et un polymère hydrophobe qui constitue une couche interne de ladite enveloppe, située à l'interface entre la couche externe de l'enveloppe et le cœur essentiellement liquide.

Le polymère hydrophobe est choisi parmi les homopolymères de monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux et/ou avec d'autres comonomères, tels que les acrylates d'alkyle et les méthacrylates d'alkyle dans lesquels le groupement alkyle comprend de 3 à 10 atomes de carbone, les esters d'acides éthyléniques possédant 4 ou 5 atomes de carbone et d'alkyle possédant 1 à 8 atomes de carbone, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques, les composés diéniques.

Les nanosphères composites de l'invention trouvent notamment des applications dans les domaines de la peinture, des encres, des plastiques et, quand elles sont fonctionnalisées, dans des domaines divers de la biologie, en particulier pour la séparation de molécules biologiques ou biochimiques, pour des essais de diagnostic, pour la préparation de compositions thérapeutiques, prophylactiques ou cosmétiques.

Aussi, dans un mode de réalisation de l'invention les nanosphères composites présentent à la surface de l'enveloppe des groupements fonctionnels susceptibles d'interagir avec des molécules, par exemple des molécules biologiques, lesdits groupements fonctionnels étant apportés (i) soit par un traitement de la surface de l'enveloppe, par exemple chimique tel que par hydrolyse ou greffage de groupements fonctionnels, (ii) soit par addition d'au moins un monomère fonctionnel, tel que acide méthacrylique, acide acrylique, acide étaconique, aminoéthylméthacrylate, aminopropylméthacrylamide, (iii) soit par addition d'un amorceur fonctionnel, tel que le diméthyl 2,2'-azobis(2-

méthylpropionate), le 4,4'-azobis(4-acide cyanovalérique) et le 2,2'-azobis(2-cyanopropanol).

Les nanosphères composites ainsi fonctionnalisées peuvent être utilisées pour la concentration d'acides nucléiques selon le protocole décrit dans la demande de brevet EP O 842 184 ou pour la concentration de protéines conformément au protocole décrit dans la demande de brevet WO 99/35500.

Ainsi, les nanosphères composites de l'invention peuvent être fonctionnalisées et présenter à la surface de l'enveloppe des groupements fonctionnels réactifs, tels que des groupements carboxylique, amine, thiol, hydroxyl, tosyl, hydrazine, susceptibles de réagir avec au moins un ligand.

Les nanosphères composites fonctionnalisées ainsi formées seront susceptibles d'immobiliser un ligand, par exemple une molécule biologique, telle qu'un anticorps, un fragment d'anticorps, une protéine, un polypeptide, une enzyme, un polynucléotide, une sonde, une amorce, un fragment d'acide nucléique ; des molécules chimiques, telles que des polymères chimiques, des substances médicamenteuses, des molécules cages, des agents chélatants, des catalyseurs, la biotine.

La présente invention a également pour objet des conjugués dérivés des nanosphères composites de l'invention couplés à au moins un ligand tel que défini ci-dessus et leurs utilisations.

A titre d'exemple, lesdits conjugués sont utilisés dans des tests immunologiques pour la détection et/ou la quantification de protéines, d'antigènes, d'anticorps dans un échantillon biologique ou dans des essais utilisant la technologie des sondes pour la détection et/ou la quantification d'un acide nucléique ou d'un fragment d'acide nucléique dans un échantillon biologique. L'utilisation de sondes pour la détection et/ou la quantification d'un acide nucléique dans un échantillon est bien connue de l'homme du métier et on peut citer à titre d'illustration la technique d'hybridation sandwich. De même, les conjugués de l'invention peuvent être utilisés comme « agents porteurs d'amorces » pour une réaction d'amplification d'acides nucléiques dans un échantillon, par exemple par PCR (Polymerase Chain Reaction) ou toute autre

technique d'amplification appropriée, permettant ainsi la détection et/ou la quantification d'acides nucléiques dans l'échantillon biologique.

La présente invention a donc également pour objet un réactif et une composition diagnostiques comprenant entre autre lesdites nanosphères composites ou lesdits conjugués et l'utilisation dudit réactif dans un essai analytique, par exemple pour la concentration de protéines ou d'acides nucléiques ou encore dans un essai diagnostique.

Les conjugués trouvent également une application dans le domaine thérapeutique ou prophylactique comme véhicule ou vecteur d'une substance médicamenteuse, d'un agent réparateur de gènes défectueux, d'un agent susceptible de bloquer ou d'inhiber l'expression d'un gène, tel qu'une sonde anti-sens en thérapie ou d'un agent susceptible de bloquer ou d'inhiber l'activité d'une protéine et de ce fait ils peuvent être utilisés dans une composition thérapeutique ou prophylactique.

Ainsi, les conjugués de l'invention sont susceptibles de véhiculer une substance médicamenteuse dans une composition thérapeutique ou prophylactique qui comprend ledit conjugué en association avec un adjuvant et/ou diluant et/ou excipient approprié et pharmaceutiquement acceptable, ladite substance médicamenteuse étant capable d'être relarguée *in vivo*. Les définitions des excipients et adjuvants pharmaceutiquement acceptables sont décrits par exemple dans Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed., Mack Publishing Co.

Les conjugués de l'invention sont également susceptibles de véhiculer un gène d'intérêt thérapeutique codant pour au moins une protéine d'intérêt ou un fragment d'une protéine d'intérêt, étant entendu que par protéine on entend à la fois une protéine dans sa définition la plus généralement utilisée et un anticorps. Bien entendu, un tel conjugué est incorporé dans une composition thérapeutique ou prophylactique qui comprend également les éléments nécessaires à l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique.

Les conjugués de l'invention sont également utilisables, quand incorporés dans une composition thérapeutique ou prophylactique, pour le transfert *in vivo* de sondes ou oligonucléotides anti-sens. Les anti-sens sont

capables d'interférer spécifiquement avec la synthèse d'une protéine cible d'intérêt, par inhibition de la formation et/ou du fonctionnement du polysome selon le positionnement de l'ARNm dans la cible. Donc le choix fréquent de la séquence entourant le codon d'initiation de la traduction comme cible pour une

5 inhibition par un oligonucléotide anti-sens vise à prévenir la formation du complexe d'initiation. D'autres mécanismes dans l'inhibition par des oligonucléotides anti-sens impliquent une activation de la ribonucléase H qui digère les hybrides oligonucléotide anti-sens/ARNm ou une interférence au niveau de sites d'épissage par des oligonucléotides anti-sens dont la cible est un

10 site d'épissage de l'ARNm. Les oligonucléotides anti-sens sont également complémentaires de séquences ADN et peuvent donc interférer au niveau de la transcription par la formation d'une triple hélice, l'oligonucléotide anti-sens s'appariant par des liaisons hydrogène dites de Hoogsteen au niveau du grand sillon de la double hélice d'ADN. Dans ce cas particulier, on parle plus

15 précisément d'oligonucléotides antigènes. Il est bien entendu que les oligonucléotides anti-sens peuvent être strictement complémentaires de la cible ADN ou ARN à laquelle ils doivent s'hybrider, mais aussi non strictement complémentaires à la condition qu'ils s'hybrident à la cible. De même, il peut s'agir d'oligonucléotides anti-sens non modifiés ou modifiés au niveau des

20 liaisons inter-nucléotidiques. Toutes ces notions font partie des connaissances générales de l'homme de l'art.

La présente invention concerne donc une composition thérapeutique comprenant, entre autres, un conjugué vecteur d'un oligonucléotide anti-sens tel que définis ci-dessus.

25 Enfin, les conjugués sont également susceptibles de former des complexes du type molécule cage/cryptate, chélatant/molécule chélatée ou de servir de véhicule pour des catalyseurs dans une application chimique.

Les nanosphères composites et les conjugués de l'invention sont obtenus par un procédé d'encapsulation par polymérisation d'une émulsion

30 selon le protocole décrit dans les exemples qui suivent et l'invention concerne également un tel procédé de préparation.

Selon le procédé de l'invention, (i) on dispose d'une émulsion de départ stable et isodisperse constituée de deux phases non miscibles; une phase A hydrophobe constituée de gouttelettes contenant des nanoparticules inorganiques dispersées de manière homogène dans une phase organique contenant un agent tensio actif, ladite phase A étant dispersée dans une phase B hydrophile, (ii) on introduit dans la phase hydrophile B au moins un monomère hydrosoluble, un agent de réticulation hydrosoluble et un amorceur de polymérisation hydrosoluble, et (iii) on polymérise le monomère hydrosoluble en présence de l'agent de réticulation et de l'amorceur.

Dans un mode de réalisation de l'invention, préalablement à l'étape (ii) on introduit dans la phase hydrophile au moins un monomère hydrophobe et un premier amorceur de polymérisation hydrosoluble, puis on réalise l'addition dans la phase hydrophile d'au moins le monomère hydrosoluble et de l'agent de réticulation et éventuellement, si nécessaire, un deuxième amorceur de polymérisation hydrosoluble qui est identique ou différent du premier amorceur, étant entendu que l'addition d'un deuxième amorceur de polymérisation n'est utile que si la quantité du premier amorceur de polymérisation est limitée ou insuffisante pour conduire à bien la polymérisation complète. La quantité totale d'amorceur est comprise entre 1 et 10% molaire, de préférence entre 1 et 5% molaire par rapport à la concentration totale en monomères.

L'amorceur hydrosoluble est choisi parmi les sels de peroxydisulfate, c'est à dire les persulfates, tels que le persulfate de potassium, le persulfate de sodium et le persulfate d'ammonium; les hydroperoxydes, tels que, l'hydroperoxyde de cumène; le peroxyde d'hydrogène; l'hydrochlorure de 2-2'-azobis-amidinopropane, le diméthyl 2,2'-azobis(2-méthylpropionate), le 4,4'-azobis(4-acide cyanovalérique) et le 2,2'-azobis(2-cyanopropanol). Parmi ceux ci, le diméthyl 2,2'-azobis(2-méthylpropionate), le 4,4'-azobis(4-acide cyanovalérique) et le 2,2'-azobis(2-cyanopropanol) sont des amorceurs fonctionnels. Les persulfates sont des amorceurs solubles dans l'eau. Une décomposition sous l'action de la chaleur génère des anions à radicaux sulfate qui contribueront à charger la nanosphère. Le peroxyde d'hydrogène se décompose dans l'eau pour former des radicaux hydroxyles qui ne sont pas

chargés. Les hydroperoxydes sont solubles à la fois en phase aqueuse et dans des particules constituées de monomères. La décomposition des hydroperoxydes génère un hydroxyle et un autre radical oxygéné qui se partageront dans une des phases en fonction du type de peroxyde utilisé.

5 L'hydroperoxyde de cumène dans le cas de la polymérisation de styrène est supposé se décomposer au niveau de l'interface entre la particule de monomères et l'eau, les radicaux hydroxyles entrent dans la phase aqueuse et les radicaux non polaires diffusent vers la particule. De la nature cationique ou anionique de l'amorceur dépendra le caractère cationique ou anionique de la
10 nanosphère composite de l'invention et du conjugué résultant.

L'agent amorceur est introduit dans la phase hydrophile soit simultanément à l'introduction des monomères, soit préalablement à leur introduction, soit encore postérieurement à leur introduction.

Le monomère hydrosoluble et la monomère hydrophobe répondent
15 aux définitions données précédemment.

L'agent de réticulation hydrosoluble est choisi parmi le N,N'-méthylènebisacrylamide (MBA) et l'éthylène glycol diméthacrylate.

La phase organique hydrophobe A est une phase comprenant un hydrocarbure aliphatique ou cyclique choisi parmi les composés comprenant de
20 5 à 12 atomes de carbone, leurs isomères et leurs mélanges. En particulier, l'hydrocarbure est choisi parmi le pentane, l'hexane, l'heptane, l'octane, le nonane, le décane, le undécane, le dodécane, étant entendu que lorsque la polymérisation est effectuée par élévation de la température, l'homme du métier doit adapter le montage réactionnel à des composants volatils, tels que le
25 pentane, et à la nature de l'amorceur de polymérisation choisi. La phase B est une phase aqueuse, telle que de l'eau.

La polymérisation est effectuée de préférence par élévation de la température jusqu'à environ 60 à environ 90°C, de préférence à environ 70°C, en présence de l'amorceur de polymérisation, étant entendu que les conditions
30 de polymérisation seront déterminées par l'homme du métier en fonction de la nature de l'amorceur choisi ; ou par photochimie à l'aide de rayonnements, tels que des rayonnements UV ou un faisceau laser ou d'autres sources d'énergie.

Exemple 1 :

5 Une émulsion de départ stable et isodisperse a été préparée conformément à l'un ou l'autre des protocoles décrits dans cet exemple.

(i) L'émulsion primaire a été préparée à l'aide d'un procédé d'émulsification en incorporant progressivement, tout en cisillant à l'aide d'un moulin colloïdal (Ika : nom commercial), la phase dispersée, formée de 45% en poids d'oxydes de fer dans de l'octane, à la phase continue formée de dodécyl sulfate de sodium à une concentration de 50% en poids dans l'eau jusqu'à l'obtention de fractions comprenant de 80% en poids de ferrofluide organique. Le mélange ainsi défini a été fragmenté dans une couette de type PG398 à un taux de cisaillement préalablement déterminé. L'émulsion primaire ainsi préparée est une émulsion polydisperse caractérisée par une distribution large du diamètre des gouttelettes qui est ensuite traitée par des tris magnétiques successifs pour l'obtention de l'émulsion de départ isodisperse en taille.

(ii) L'émulsion primaire a été préparée à l'aide d'un procédé d'émulsification en ajoutant rapidement la phase dispersée, formée d'octane, de 73% en poids d'oxydes de fer et d'un agent tensio-actif lipophile de type monoglycérol ou polyglycérol de polyrisinoléate (1 à 10% en poids), à la phase continue formée de tensio-actif de type tergitol NP10 (31% en poids) grâce à une spatule. Le mélange ainsi défini est ensuite fragmenté dans une couette de type PG398 à un taux de cisaillement préalablement défini. L'émulsion primaire ainsi préparée est une émulsion relativement isodisperse caractérisée par une distribution faible du diamètre des gouttelettes qui est ensuite traitée par des tris magnétiques successifs pour l'obtention de l'émulsion de départ isodisperse en taille.

Exemple 2 :

Dans un ballon de polymérisation de 25 ml, sont versés 20ml d'émulsion (1% en poids dispersée dans du dodécylsulfate de sodium (SDS) à

0,8 fois la concentration micellaire critique (CMC) et dans l'eau). La solution est dégazée par bullage sous azote pour chasser l'air pendant 9 heures. 24 μ l de monomères styrène et 4,3 mg de l'amorceur persulfate de potassium solubilisé dans 0,4 ml d'eau sont introduits et le mélange est gardé sous agitation pendant 2 heures. La température est ensuite élevée à 70°C, sous agitation pendant 20 minutes. Le mélange (280 mg de N-isopropylacrylamide solubilisé dans 1 ml d'eau, 11 mg de méthylène bisacrylamide solubilisé dans 0,4 ml d'eau, 30 μ l d'acide méthacrylique) est introduit sur une période de 30 minutes. La polymérisation est conduite pendant 12 heures sous atmosphère d'azote et à une température de 70°C. La présence de groupements fonctionnels est assurée par l'acide méthacrylique.

Le latex magnétique final présente les caractéristiques suivantes à 20°C: Le diamètre déterminé par diffusion de lumière est de 192 nm plus ou moins 5 nm. Le taux d'oxyde de fer est d'environ 75%.

Exemple 3 :

Dans un réacteur de polymérisation de 50 ml, sont versés 15 ml d'émulsion (0,7% dispersée dans du SDS à 1 fois la CMC et dans l'eau). La solution est dégazée par bullage sous azote pendant 3h:30 min. 7 μ l de monomères styrène et 2 μ l d'acide méthacrylique sont introduits et le mélange est gardé sous agitation pendant 20 minutes. L'amorceur (persulfate de potassium, 2 mg), solubilisé dans 0,1ml d'eau est introduit et la solution est homogénéisée pendant 10 minutes. La température est ensuite élevée à 70°C, sous agitation pendant 25 minutes. Le mélange suivant (80 mg de N-isopropylacrylamide solubilisé dans 0,5 ml d'eau, 6 μ l d'acide méthacrylique, 4 μ l de styrène) est introduit comme suit :

Introduction de 200 μ l de mélange et homogénéisation pendant 30 minutes suivie d'une introduction de 200 μ l de mélange et homogénéisation pendant 30 minutes avant d'introduire les autres composants du mélange. La réaction de polymérisation est conduite sous agitation 300 tpm pendant 16 heures sous atmosphère d'azote et à une température de 70°C. La présence de groupements fonctionnels est assurée par l'acide méthacrylique.

Le latex magnétique final présente les caractéristiques suivantes: un diamètre de 187 nm à 20°C plus ou moins 5 nm déterminé par diffusion de lumière et un taux d'oxyde de fer d'environ 70%. Potentiel zeta -50 mV à pH 10 et 0 mV à pH 4,5.

5

Exemple 4 :

Dans un ballon de polymérisation de 50 ml sont introduits 15 ml de d'une émulsion (0,7% dispersée dans l'eau à 1 fois la CMC en triton X405). Cette émulsion est préalablement dégazée par bullage sous azote pendant 5
10 heures. 7 μ l de monomères styrène et de 2 mg de N-(3-aminopropyl)méthacrylamide solubilisé dans 0,2ml d'eau sont introduits. Le mélange est homogénéisé pendant 25 minutes avant d'introduire 2 mg de l'hydrochlorure de 2-2'-azobis-amidinopropane, l'amorceur, solubilisé dans 0,2 ml d'eau. Après homogénéisation de 20 minutes, la température est élevée à
15 70°C pendant 25 minutes et le mélange suivant (80 mg de N-isopropylacrylamide solubilisé dans 0,5 ml d'eau, 2 mg de méthylène bisacrylamide solubilisé dans 0,1 ml d'eau, 6 mg de N-(3-aminopropyl)méthacrylamide solubilisé dans 0,1 ml d'eau) est introduit comme de la façon suivante :

20

Introduction de 0,2 ml de mélange et homogénéisation pendant 20 minutes, introduction de 0,2 ml de mélange et homogénéisation pendant 30 minutes, introduction du reste du mélange.

25

La réaction de polymérisation est conduite sous agitation 300 tpm pendant 16 heures sous atmosphère d'azote et à une température de 70°C. La présence de groupements amines est assurée par le N-(3-aminopropyl)méthacrylamide.

30

Le latex magnétique final présente les caractéristiques suivantes: un diamètre de 187 nm plus ou moins 5 nm à 20°C déterminé par diffusion de lumière et un taux d'oxyde de fer de l'ordre de 70%. Potentiel zeta +50 mV à pH4, -50 mV à pH 10.

Exemple 5 :

A 240 μ l d'un latex magnétique à 3%, obtenu comme décrit précédemment, sont ajoutés successivement, 60 μ l de Tween 20 (1%), 636 μ l de tampon phosphate (10 mM à pH 6,9), 60 μ l de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimidedihydrochlorure (25 mg/ml), 156 μ l de N-hydroxysulfosuccinimide (25 mg/ml) et de la streptavidine (48 μ l à 1 mg/ml).

Le mélange est incubé pendant une heure à température ambiante et les particules sont ensuite concentrées par application d'un champ magnétique, puis redispersées dans le tampon contenant du tensio-actif (phosphate 10 mM, pH 6,9 + Tween 20 0,05%).

9,9 μ l d'un oligonucléotide biotinyté (ODN) de 17 mers présentant une masse de 5753 g/mole à une concentration de 338 nmoles/ml) sont ajoutés à 400 μ l de particules recouvertes de streptavidine synthétisées précédemment pour constituer le témoin positif. 20 μ l d'un oligonucléotide non biotinyté et non aminé de 17 mers (masse : 6452 g/mole à une concentration de 167 nmoles/ml) sont ajoutés à 400 μ l de particules recouvertes de streptavidine synthétisées précédemment pour constituer le témoin négatif.

Les deux témoins sont incubés 30 minutes à température ambiante, séparés trois fois et redispersés la première fois avec un tampon basique (phosphate 10 mM, pH 9,9 + SDS, 5 fois la concentration micellaire critique, la seconde fois avec un tampon à pH neutre (phosphate 10 mM, pH 6,9 + Tween 20 0,05 %) et la troisième fois dans 280 μ l de PEG contenant de l'ADN de sperme de saumon.

Dans les deux cas 20 μ l d'ODN complémentaire à l'ODN du témoin positif marqués à la peroxydase de raifort (17 mers, concentration 9 nmoles/ml) sont ajoutés.

Les deux témoins sont à nouveau incubés une heure à température ambiante et sont encore séparés pour être dispersés de nouveau dans 400 μ l de PEG contenant de l'ADN de sperme de saumon.

50 μ l d'ortho-phénylènediamine sont ajoutés à 50 μ l de particules. La réaction enzymatique est effectuée pendant 5 minutes et arrêtée par l'addition de 50 μ l d'acide sulfurique (1M).

Les particules sont séparés du surnageant et ce dernier est dosé par méthode colorimétrique sur un appareil Axia Microreader (nom commercial, bioMérieux) à 492 et 630 nm.

Le témoin positif donne une densité optique de 2 000 unités de D.O,
5 alors que le témoin négatif donne une densité de 1 000 unités de D.O.

La fluctuation de taille observée, avant et après polymérisation dans les exemples qui précèdent, est attribuée à la combinaison des deux phénomènes suivants : a) une éventuelle évaporation d'une partie de la phase
10 organique et b) la conversion de la polymérisation d'un exemple à l'autre. Le taux d'oxyde de fer après polymérisation est sensiblement du même ordre de grandeur que dans l'émulsion utilisée avant polymérisation.

REVENDICATIONS

1. Nanosphères composites caractérisées en ce qu'elles présentent un diamètre compris entre environ 50 et 1000 nm plus ou moins 5%, de
5 préférence entre environ 100 et 500 nm plus ou moins 5% et avantageusement entre 100 et 200 nm plus ou moins 5%, et comprennent :

- un cœur essentiellement liquide constitué d'une phase organique et de nanoparticules inorganiques distribuées à l'intérieur de la phase organique, et
- une enveloppe constituée au moins d'un polymère hydrophile qui
10 est issu de la polymérisation d'au moins un monomère hydrosoluble, en particulier un N-alkylacrylamide ou un N-N-dialkylacrylamide.

2. Nanoparticules composites selon la revendication 1, caractérisées en ce que le monomère hydrosoluble est choisi parmi le N-isopropylacrylamide, le N-méthylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, le N-n-propylacrylamide, le N-
15 n-propylméthacrylamide, le N-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide.

3. Nanosphères composites selon la revendication 1, caractérisées en ce que le cœur essentiellement liquide comprend :

- 20 - (i) un hydrocarbure aliphatique ou cyclique choisi parmi les composés comprenant de 5 à 12 atomes de carbone, leurs isomères et leurs mélanges.

- (ii) des nanoparticules inorganiques choisies parmi les oxydes métalliques de fer, de titane, de cobalt, de zinc, de cuivre, de manganèse, de
25 nickel ; la magnétite ; l'hématite, les ferrites telles que les ferrites de manganèse, nickel, manganèse-zinc ; les alliages de cobalt, nickel ; les zéolites ; le talc ; les argiles telles que bentonite et kaolin ; l'alumine ; la silice ; le graphite ; le noir de carbone ou autres matériaux inorganiques.

4. Nanosphères composites selon la revendication 3, caractérisées
30 en ce que les nanoparticules sont choisies parmi les oxydes métalliques de fer, de titane, de cobalt, de zinc, de cuivre, de manganèse, de nickel ; la magnétite ;

l'hématite, les ferrites telles que les ferrites de manganèse, nickel, manganèse-zinc; les alliages de cobalt, nickel.

5 5. Nanosphères composites selon la revendication 3, caractérisées en ce que le cœur comprend de plus un marqueur, tels qu'un marqueur fluorescent, luminescent ou radioactif.

6. Nanosphères composites selon la revendication 3, caractérisées en ce que l'hydrocarbure est choisi parmi le pentane, l'hexane, l'heptane, l'octane, le nonane, le décane, le undécane et le dodécane.

10 7. Nanosphères composites selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce que les nanoparticules inorganiques représentent de 5 à 95%, de préférence de 10 à 90%, de manière encore plus préférée de 20 à 80% et avantageusement de 50 à 80% en masse par rapport à la masse totale des nanosphères composites.

15 8. Nanosphères composites selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce que l'enveloppe comprend un polymère hydrophile tel que défini dans les revendications 1 ou 2, ledit polymère constituant une couche externe de ladite enveloppe et un polymère hydrophobe qui constitue une couche interne de ladite enveloppe, située à l'interface entre la couche externe de l'enveloppe et le cœur essentiellement liquide.

20 9. Nanosphères composites selon la revendication 8, caractérisées en ce que le polymère hydrophobe est choisi parmi les homopolymères de monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux et/ou avec d'autres comonomères, 25 tels que les acrylates d'alkyle et les méthacrylates d'alkyle dans lesquels le groupement alkyle comprend de 3 à 10 atomes de carbone, les esters d'acides éthyléniques possédant 4 ou 5 atomes de carbone et d'alkyle possédant 1 à 8 atomes de carbone, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques, les composés diéniques.

30 10. Nanoparticules composites selon les revendications 1 à 9, caractérisées en ce qu'elles présentent de plus à la surface de l'enveloppe des groupements fonctionnels réactifs, tels que des groupements carboxylique,

amine, thiol, aldéhyde, hydroxyl, tosyl, hydrazine, susceptibles de réagir avec au moins un ligand.

11. Conjugués dérivés des nanoparticules composites selon la revendication 10, caractérisées par le fait qu'ils sont couplés à au moins un ligand choisi parmi un anticorps, un fragment d'anticorps, une protéine, un polypeptide, une enzyme, un polynucléotide, une sonde, une amorce, un fragment d'acide nucléique et la biotine.

12. Réactif, comprenant entre autre au moins une nanosphère telle que définie dans les revendications 1 à 10 ou un conjugué tel que défini dans la revendication 11.

13. Composition diagnostique comprenant entre autre un réactif tel que défini dans la revendication 11.

14. Utilisation d'un réactif tel que défini dans la revendication 11 ou d'une composition telle que définie dans la revendication 12 dans un essai de diagnostic.

15. Conjugués dérivés de nanosphères composites selon les revendications 1 à 9, caractérisés en ce qu'ils sont couplés à au moins un ligand choisi parmi les substances médicamenteuses, les sondes anti-sens, les agents réparateurs de gènes ou les gènes d'intérêt thérapeutique, les agents bloquant ou inhibant une activité protéique.

16. Composition thérapeutique ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend, entre autre, un conjugué selon la revendication 15.

17. Utilisation d'un conjugué selon la revendication 15 pour la préparation d'une composition thérapeutique ou prophylactique.

18. Conjugués dérivés de nanosphères composites selon les revendications 1 à 8, caractérisées par le fait qu'elles sont couplées à au moins un ligand choisi parmi les molécules cages, les agents chélatants et les catalyseurs.

19. Procédé de préparation de nanosphères composites selon lequel,
(i) on dispose d'une émulsion de départ stable et isodisperse constituée de deux phases non miscibles, une phase A hydrophobe constituée de gouttelettes contenant des nanoparticules inorganiques dispersées de

manière homogène dans une phase organique contenant un agent tensio actif, ladite phase A étant dispersée dans une phase B hydrophile,

(iii) on introduit dans la phase hydrophile B au moins un monomère hydrosoluble, un agent de réticulation hydrosoluble et un amorceur de polymérisation hydrosoluble, et on polymérise le monomère hydrosoluble en présence de l'agent de réticulation et de l'amorceur.

20. Procédé selon la revendication 19, selon lequel préalablement à l'étape (ii) on introduit dans la phase hydrophile au moins un monomère hydrophobe et un premier amorceur de polymérisation et on introduit, si nécessaire, à l'étape (ii) un deuxième amorceur de polymérisation.

21. Procédé selon les revendications 19 et 20, selon lequel le premier amorceur hydrosoluble de polymérisation et éventuellement le deuxième amorceur de polymérisation sont introduits dans la phase hydrophile soit simultanément à l'addition des monomères hydrosoluble et hydrophobe respectifs, soit préalablement ou postérieurement à l'addition des monomères hydrosoluble et hydrophobe respectifs.

22. Procédé selon l'une quelconque des revendications 19 à 21, dans lequel l'amorceur hydrosoluble est choisi parmi les sels de peroxydisulfate, c'est à dire les persulfates, tels que le persulfate de potassium, le persulfate de sodium et le persulfate d'ammonium ; les hydroperoxydes, tels que, l'hydroperoxyde de cumène ; le peroxyde d'hydrogène ; l'hydrochlorure de 2-2'-azobis-amidinopropane, le diméthyl 2,2'-azobis(2-méthylpropionate), le 4,4'-azobis(4-acide cyanovalérique) et le 2,2'-azobis(2-cyanopropanol).

23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 19 à 21, caractérisé en ce que le monomère hydrosoluble est choisi parmi les N-alkylacrylamide et N-N-dialkylacrylamide, en particulier le N-isopropylacrylamide, le N-méthylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, le N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le N-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide et le monomère hydrophobe est choisi parmi les monomères vinyloaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène,

vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux et/ou avec d'autres comonomères, tels que les acrylates d'alkyle et les méthacrylates d'alkyle dans lesquels le groupement alkyle comprend de 3 à 10 atomes de carbone, les esters d'acides éthyléniques possédant 4 ou 5 atomes de carbone et d'alkyle possédant 1 à 8 atomes de carbone, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques, les composés diéniques.

24. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que le monomère hydrophobe est choisi parmi les monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butylstyrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux et/ou avec d'autres comonomères, tels que les acrylates d'alkyle et les méthacrylates d'alkyle dans lesquels le groupement alkyle comprend de 3 à 10 atomes de carbone, les esters d'acides éthyléniques possédant 4 ou 5 atomes de carbone et d'alkyle possédant 1 à 8 atomes de carbone, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques, les composés diéniques.

25. Procédé selon l'une quelconque des revendications 19 à 24, dans lequel l'agent de réticulation hydrosoluble est choisi parmi le N,N'-méthylènebisacrylamide (MBA) et l'éthylène glycol diméthacrylate.

26. Procédé selon l'une quelconque des revendications 19 à 26, dans lequel la phase organique hydrophobe A est une phase comprenant un hydrocarbure aliphatique ou cyclique choisi parmi les composés comprenant de 5 à 12 atomes de carbone, leurs isomères et leurs mélanges, en particulier parmi le pentane, l'hexane, l'heptane, l'octane, le nonane, le décane, le undécane, le dodécane et la phase B est une phase aqueuse, en particulier de l'eau.

27. Procédé selon l'une des revendications 19 à 26, caractérisée en ce que la polymérisation est effectuée par élévation de la température jusqu'à environ 60 à environ 90°C, de préférence à environ 70°C, en présence de l'amorceur de polymérisation ou par photochimie à l'aide de rayonnements, tels que des rayonnements UV ou d'un faisceau laser.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/03085

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/543 G01N33/546

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N A61K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
------------	--	-----------------------

X	US 4 358 388 A (DANIEL JEAN-CLAUDE ET AL) 9 November 1982 (1982-11-09) examples 1,2	19-27
A	---	1-18
X	EP 0 390 634 A (RHONE POULENC CHIMIE) 3 October 1990 (1990-10-03) cited in the application	19-27
A	example 1	1-18
A	WO 99 19000 A (UNIV NEW YORK) 22 April 1999 (1999-04-22) examples 1-6	1-27
A	EP 0 180 384 A (TECHNICON INSTR) 7 May 1986 (1986-05-07) page 2, line 13 - line 35 page 7, line 23 - page 8, line 15 claims 1,9,10	1-27

	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 March 2001

Date of mailing of the international search report

26/03/2001

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 00/03085

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>US 4 342 739 A (KAKIMI FUJIO ET AL) 3 August 1982 (1982-08-03) claims 1,34,35</p> <p>-----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No

PCT/FR 00/03085

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4358388	A	09-11-1982	FR 2480764 A	23-10-1981
			AT 9587 T	15-10-1984
			AU 539397 B	27-09-1984
			AU 6961881 A	22-10-1981
			BR 8102333 A	15-12-1981
			CA 1159247 A	27-12-1983
			DE 3166260 D	31-10-1984
			DK 171881 A	19-10-1981
			EP 0038730 A	28-10-1981
			ES 501397 D	16-02-1982
			ES 8203097 A	01-06-1982
			IE 51322 B	10-12-1986
			IL 62649 A	31-10-1984
			JP 1726739 C	19-01-1993
			JP 4003088 B	22-01-1992
			JP 56164503 A	17-12-1981
EP 0390634	A	03-10-1990	FR 2645160 A	05-10-1990
			AT 122704 T	15-06-1995
			AU 5239690 A	04-10-1990
			CA 2013459 A	30-09-1990
			DE 69019411 D	22-06-1995
			DE 69019411 T	09-11-1995
			ES 2072996 T	01-08-1995
			JP 2286729 A	26-11-1990
			JP 2623358 B	25-06-1997
			NO 178376 B	04-12-1995
			US 5356713 A	18-10-1994
WO 9919000	A	22-04-1999	AU 9691298 A	03-05-1999
EP 0180384	A	07-05-1986	AU 595165 B	29-03-1990
			AU 4902985 A	08-05-1986
			CA 1314769 A	23-03-1993
			DE 3582649 D	29-05-1991
			JP 2554250 B	13-11-1996
			JP 61181967 A	14-08-1986
			US 5206159 A	27-04-1993
US 4342739	A	03-08-1982	JP 1619364 C	30-09-1991
			JP 55094636 A	18-07-1980
			JP 62017709 B	18-04-1987
			JP 1408182 C	27-10-1987
			JP 56072346 A	16-06-1981
			JP 62017710 B	18-04-1987
			JP 56072347 A	16-06-1981
			JP 62019703 B	30-04-1987
			DE 3000483 A	17-07-1980
			GB 2041517 A,B	10-09-1980

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De .de Internationale No

PCT/FR 00/03085

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/543 G01N33/546

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N A61K C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 4 358 388 A (DANIEL JEAN-CLAUDE ET AL) 9 novembre 1982 (1982-11-09)	19-27
A	exemples 1,2 ---	1-18
X	EP 0 390 634 A (RHONE POULENC CHIMIE) 3 octobre 1990 (1990-10-03)	19-27
A	cité dans la demande exemple 1 ---	1-18
A	WO 99 19000 A (UNIV NEW YORK) 22 avril 1999 (1999-04-22)	1-27
A	exemples 1-6 ---	
A	EP 0 180 384 A (TECHNICON INSTR) 7 mai 1986 (1986-05-07)	1-27
	page 2, ligne 13 - ligne 35 page 7, ligne 23 - page 8, ligne 15 revendications 1,9,10 ---	
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 mars 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/03/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hart-Davis, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De .de Internationale No

PCT/FR 00/03085

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>US 4 342 739 A (KAKIMI FUJIO ET AL) 3 août 1982 (1982-08-03) revendications 1,34,35</p>	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De .de Internationale No

PCT/FR 00/03085

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4358388 A	09-11-1982	FR 2480764 A	23-10-1981
		AT 9587 T	15-10-1984
		AU 539397 B	27-09-1984
		AU 6961881 A	22-10-1981
		BR 8102333 A	15-12-1981
		CA 1159247 A	27-12-1983
		DE 3166260 D	31-10-1984
		DK 171881 A	19-10-1981
		EP 0038730 A	28-10-1981
		ES 501397 D	16-02-1982
		ES 8203097 A	01-06-1982
		IE 51322 B	10-12-1986
		IL 62649 A	31-10-1984
		JP 1726739 C	19-01-1993
		JP 4003088 B	22-01-1992
		JP 56164503 A	17-12-1981
EP 0390634 A	03-10-1990	FR 2645160 A	05-10-1990
		AT 122704 T	15-06-1995
		AU 5239690 A	04-10-1990
		CA 2013459 A	30-09-1990
		DE 69019411 D	22-06-1995
		DE 69019411 T	09-11-1995
		ES 2072996 T	01-08-1995
		JP 2286729 A	26-11-1990
		JP 2623358 B	25-06-1997
		NO 178376 B	04-12-1995
US 5356713 A	18-10-1994	US 5356713 A	18-10-1994
WO 9919000 A	22-04-1999	AU 9691298 A	03-05-1999
EP 0180384 A	07-05-1986	AU 595165 B	29-03-1990
		AU 4902985 A	08-05-1986
		CA 1314769 A	23-03-1993
		DE 3582649 D	29-05-1991
		JP 2554250 B	13-11-1996
		JP 61181967 A	14-08-1986
		US 5206159 A	27-04-1993
US 4342739 A	03-08-1982	JP 1619364 C	30-09-1991
		JP 55094636 A	18-07-1980
		JP 62017709 B	18-04-1987
		JP 1408182 C	27-10-1987
		JP 56072346 A	16-06-1981
		JP 62017710 B	18-04-1987
		JP 56072347 A	16-06-1981
		JP 62019703 B	30-04-1987
		DE 3000483 A	17-07-1980
		GB 2041517 A,B	10-09-1980